

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	上田 寛人
学位論文題目			
Single-nucleotide polymorphisms in ETV5: A risk factor for Sertoli cell-only syndrome in Japanese men?			
(日本人セルトリセルオンリーシンドローム患者におけるヒトETV5遺伝子の一塩基多型解析に関する研究)			
共著者名			
水無瀬学, 宮本俊伸, 飯島将司, 西條泰明 中島光子, 松本直通, 並木幹夫, 千石一雄			
Clinical and Experimental Obstetrics & Gynecology (in press)			
2016年 掲載予定			
研究目的			
<p>今日、日本の最も深刻な社会問題の一つとして間違いなく少子化問題が存在する。しかしながら、その背景として先進国において不妊症カップルが増加傾向にあり、現在日本では、15%のカップルが挙児希望をもちながら不妊に悩まされている。不妊症患者のうち約半数は男性側にも何らかの原因があるとされており、そのうち約10から15%に遺伝学的な要因があるとされている。男性不妊症のうち約10%が非閉塞性の無精子症であり、そのうち最も重度とされているのは精巣内に胚細胞を全く有していないSertoli cell-only syndrome (SCOS)である。SCOSは1947年に初めて提唱された症候群にも関わらず、これまで諸説はあるもののその病態機序は現在まで明らかとされていない。ETV5 (E-twenty-six variant gene 5) 遺伝子は転写因子であるEtv5をコードしており、このEtv5はマウスにおいて雄、雌ともに生殖に重要な役割を担っているとされている。近年、Etv5遺伝子のノックアウトマウスが報告され、homo-mutantの雄は精子形成過程の最初のステップに障害をきたし、胚細胞を精巣内に全く認められず、無精子症に起因する不妊を呈することが明らかにされた(文献1)。このノックアウトマウスの表現型はヒトにおけるSCOSと完全に一致するものである。その後、ともに白人であるオーストラリア人とアメリカ人の無精子症患者群においてヒトETV遺伝子の解析が行われアメリカ人においてその関与は否定的な結果であったが、オーストラリア人においては無精子症患者群と正常コントロール群を比較するとヒトETV5遺伝子の多型の出現頻度において有意な差があるとの報告がなされた(文献2)。そこで、今回は組織学的にSCOSと診断された日本人無精子症患者140名とすでに妊孕性が確認されている健常日本人116名において、ヒトETV5遺伝子が日本人SCOS患者の発症に関与しているのかどうかを解析した。</p>			

材 料 ・ 方 法

本研究は旭川医科大学倫理委員会の承認を得て、また本研究にご協力いただいたすべての患者及び健常者は事前に文章によるインフォームド・コンセントを得たのちに血液を採取し、Genomic DNAを抽出した。患者群は合計140名であり、組織学的にSCOSに起因する無精子症と診断され、かつ染色体異常及び化学療法など精子形成に異常をきたすような既往歴がないことを事前に確認してある。正常コントロール群である116名の男性は不妊治療歴がなく、少なくとも1名以上の子供がいる健康な日本人男性である。患者群140名のGenomic DNAを用いてPCR法を施行し、得られたPCR産物をカラムにて精製後、アガロースゲルを用いて電気泳動を行いPCR産物の濃度チェックを行った後にダイレクトシーケンス解析にてETV5遺伝子の全てのcoding region並びに隣接するイントロン領域においてmutation解析を施行した。上記において変異を認めた部位を正常コントロール群116名においても同様にダイレクトシーケンス解析を行い、両者の結果をFisher exact testを用いて統計学的に解析した。

成 績

140名の日本人SCOS患者においてヒトETV5遺伝子の全てのcoding regionにおいてmutation解析を施行したところ、明らかなmutationを検出することはできなかった。しかしながら、ETV5遺伝子内に以下の4つの一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism: SNP) を検出することができた。まずエクソン2における5' UTR領域においてc. -55G>A (SNP1), c. -17G>A (SNP2) また、エクソン7におけるc. 421C>A (p. Leu141Ile) (SNP3) さらにはイントロン11においてc. 1209+51G>T (SNP4) を認めた。これらの4つのSNPに関して正常コントロール群116名においても同様に多型解析を行った。解析の結果、SNP2 (p=0.002)、及び SNP3 (p<0.001) においてBonferroni correctionを適用しても明らかに患者群においてゲノタイプ、アレルの出現頻度ともに統計学的に有意に高かった。またSNP1及びSNP4では患者群とコントロール群において有意差を認めなかった。今回検出されたSNP2及びSNP3は先行論文であるオーストラリア人における解析では認められなかった多型部位である。

考 案

今日までの分子生物学及びマウスの研究成果から哺乳動物の生殖にかかわる多くの遺伝子群の同定並びに病態機序が明らかとされてきた。マウスにおいては400以上の遺伝子が雄もしくは雌の生殖活動に何らかの関与がなされていることがすでに判明している(文献3)。しかしながら、それらのマウスにおける重要な知見がヒトにおいて還元されているケースは極めて稀であり、ヒト男性不妊症に関与していると判明した遺伝子は極めて少ないのが現状である。2012年、O' Bryan らはオーストラリア人及びアメリカ人無精子症患者DNAを用いて、ETV5遺伝子のエクソン内に5つ、イントロン内に7つの計12個のSNPを検出し、イントロン内の1つの SNPにおいてオーストラリア人患者群とコントロール群において、そのSNPの出現頻度に有意差を認めたと報告した(文献2)。今回の私の日本人無精子症患者における解析ではこのSNPを認めなかった。加えて私が独自に検出したSNP2とSNP3において患者群とコントロール群でゲノタイプ、アレルの出現頻度に有意な差を認めるとともに、SNP3はcoding region内における多型であり、コントロール群116名ではSNP3を1例も認めなかった。同時にSNP3はアミノ酸の置換(p. Leu141Ile)を伴うことより、今後SNP3の機能解析を行う必要があると思われる。

結 論

本研究において、ヒトETV5遺伝子の一塩基多型が、日本人男性不妊症、特に組織学的にその原因がSCOSに起因する無精子症、さらには日本人における精子形成過程初期に何らかの関与があることが示唆された。




引 用 文 献

1. Tyagi G., Carnes K., Morrow C., Kostereva N.V., Ekman G.C., Meling D.D. et al. Loss of Etv5 decreases proliferation and RET levels in neonatal mouse testicular germ cells and causes an abnormal first wave of spermatogenesis. *Biol Reprod.*, 2009, 81, 258-266.
2. O'Bryan M.K., Grealy A., Stahl P.J., Schlegel P.N., McLachlan R.I., Jamsai D. Genetic variants in the ETV5 gene in fertile and infertile men with nonobstructive azoospermia associated with Sertoli cell-only syndrome. *Fertil Steril.*, 2012, 98, 827-835.
3. Matzuk M.M., Lamb D.J. The biology of infertility: research advances and clinical challenges. *Nat Med.*, 2008, 14, 1197-1213.

参 考 论 文

1. Ueda H, Miyamoto T, Tsurusaki Y, Minase G¹, Matsumoto N, Sengoku K. Rapid diagnostic testing of a newborn in a family with hypertrophic cardiomyopathy. *Clin Exp Obstet Gynecol.* (in press) 2016年掲載予定
2. Miyamoto T, Minase G, Okabe K, Ueda H, Sengoku K. Male infertility and its genetic causes. *J Obstet Gynaecol Res.*, 2015, 41, 1501-1505.
3. Miyamoto T, Koh E, Tsujimura A, Miyagawa Y, Minase G, Ueda H, Namiki M, Sengoku K. SIN3A mutations are rare in men with azoospermia. *Andrologia.* 2015, 47, 1083-1085.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏 名	上田 寛人
審査委員長 清水 恵子 			
審査委員 柿崎 秀宏 			
審査委員 西條 泰明 			
<h3 style="margin: 0;">学 位 論 文 題 目</h3> <p style="margin: 10px 0 0 0;"> Single-nucleotide polymorphisms in <i>ETV5</i>: A risk factor for Sertoli cell-only syndrome in Japanese men? (日本人セルトリセルオンリーシンドローム患者におけるヒト <i>ETV5</i> 遺伝子の一塩基多型解析に関する研究) </p>			
<p>近年、不妊症患者は増加傾向にあり、その 50% は男性側に要因があるとされる。</p> <p>男性不妊症の原因の一つである非閉塞性無精子症のうち、最も重度である Sertoli cell-only syndrome (SCOS) の発症機序は、未だ明らかにされていない。</p> <p>本研究は、SCOS に着目し、ヒト無精子症発症における <i>ETV5</i> (E-twenty-six variant gene 5) 遺伝子の関与を明らかにすることを目的としたものである。</p> <p><i>ETV5</i> 遺伝子は、転写因子である <i>Etv5</i> をコードしており、この <i>Etv5</i> はマウスにおいて雄、雌ともに生殖に重要な役割を担っているとされている。近年、<i>Etv5</i> 遺伝子のノックアウトマウスが報告され、homo-mutant の雄は精子形成過程の最初のステップに障害をきたし、胚細胞が精巣内に全く認められず、無精子症に起因する不妊を呈することが明らかにされた。このノックアウトマウスの表現型はヒトにおける SCOS と完全に一致するものである。</p>			

そこで、本研究では組織学的に SCOS と診断された日本人無精子症患者 140 名と、すでに妊孕性が確認されている健常日本人男性 116 名において、ヒト ETV5 遺伝子が日本人 SCOS 患者の発症に関与しているかどうかを解析した。解析の結果、ヒト ETV5 遺伝子内に 4 つの一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism: SNP) を検出し、そのうち 2 つの SNP において、正常コントロール群と比して患者群では、ゲノタイプ、アレルの出現頻度がともに統計学的に有意に高いことを明らかにした。本研究成果は、ヒト ETV5 遺伝子の一塩基多型が、日本人男性不妊症、特に組織学的にその原因が SCOS に起因する無精子症、さらには日本人における精子形成過程初期に何らかの関与をしていることを明らかにし、精子形成機序の解明に貢献するものであり、学術的価値は極めて高いと判断される。また、口頭試問においても、産婦人科学及び分子遺伝学において豊富な知識、見識を有しており、分子生物学的な十分な技術を有することを確認した。

以上の審査結果から、本審査委員会は本論文が学位論文としてふさわしい内容であると判断する。